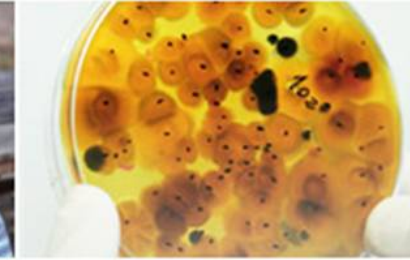




18th SPGH Annual Reunion

Armandina Miranda

Conflict of interest : nothing to disclose



Hemoglobinopatias em Portugal e estratégias de Prevenção: Contributo do laboratório de Hematologia e Bioquímica

Armandina Miranda

Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças
Não Transmissíveis
UDR

armandina.miranda@insa.min-saude.pt



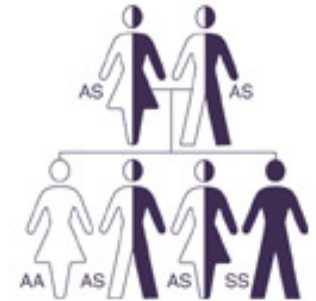
SPGH

18ª Reunião Anual da SPGH-2014



Hemoglobinopatias

doenças monogénicas hereditárias de transmissão autossómica recessiva resultantes de mutações que afetam os genes responsáveis pela síntese das cadeias de globina da hemoglobina, ou as suas regiões regulatórias.



Podem ser classificadas em dois grupos principais:

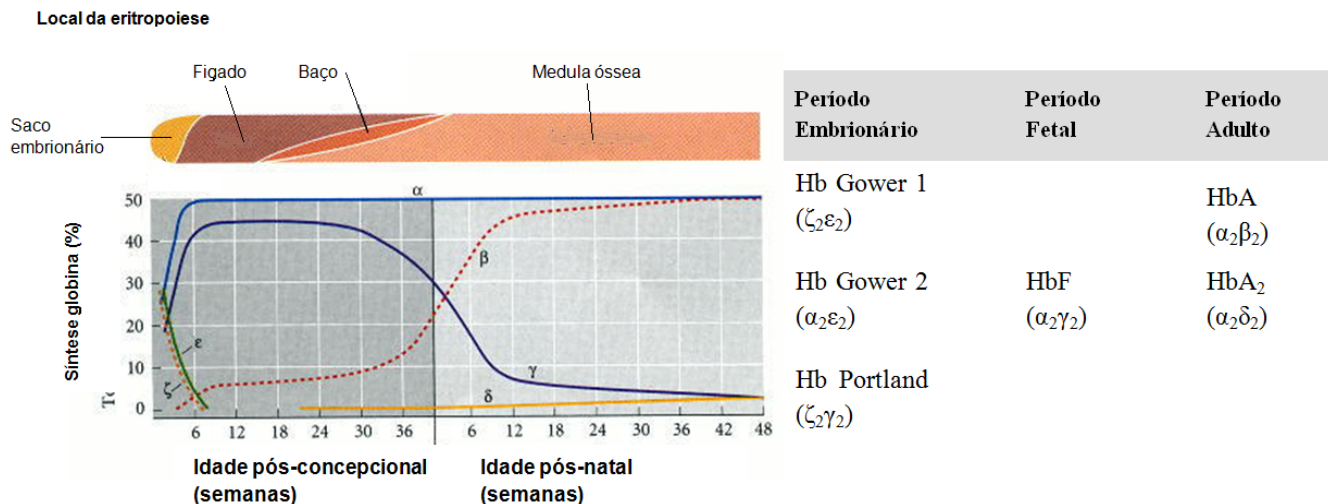
✓ Talassemias

Resultam da diminuição ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias de globina. Ex β - talassemia, α - talassémia

✓ Variantes estruturais

Hemoglobinas de estrutura anómala- 95% devidas à substituição de um aminoácido, Ex Hb S, Hb C, Hb D, Hb E, Hb Lepore

Hemoglobinas humanas nos diferentes períodos do desenvolvimento



Hemoglobinas humanas na vida adulta

Hemoglobina	cadeias	percentagem
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	96 a 98 % da Hb total
Hb A₂	$\alpha_2\delta_2$	2 a 3,0 % da Hb total
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	< 1 % da Hb total

A forma mais eficaz de controlo desta patologia é a prevenção:

- Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias**
- Aconselhamento genético de casais em risco**
- Oferta de diagnóstico pré-natal**
- Estabelecimento de centros de referência de acordo com as recomendações**
- Investigação em hemoglobinopatias**
- Realização de registos**
- Formação do pessoal de saúde e do público em geral**

A forma mais eficaz de controlo desta patologia é a prevenção:

Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

rastreios e confirmações em colaboração com laboratórios de saúde pública, e outras entidades de saúde, públicas e privadas

Aconselhamento genético de casais em risco

Oferta de diagnóstico pré-natal

Estabelecimento de centros de referência de acordo com as recomendações

Investigação em hemoglobinopatias

Realização de registos

Formação do pessoal de saúde e do público em geral

estágios, atividades letivas, seminários, elaboração de folhetos de divulgação, colaboração com o PNAEQ

- ❑ Detecção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

Metodologias utilizadas na caracterização analítica do fenótipo:

- ✓ **Hemograma- eritrograma com índices eritrocitários**

Hb, GV, HGM, VGM e RDW

Cut-off portadores talassémia: HGM < 27 pg e VGM < 80 fL

- ✓ **Técnicas electroforéticas**

Focagem isoelétrica em gel de poliacrilamida

- ✓ **Técnicas cromatográficas**

HPLC de troca iónica da hemoglobina

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

- ✓ **Estudos funcionais da Hb**

Teste de solubilidade da HbS

Teste de estabilidade - Teste do isopropanol

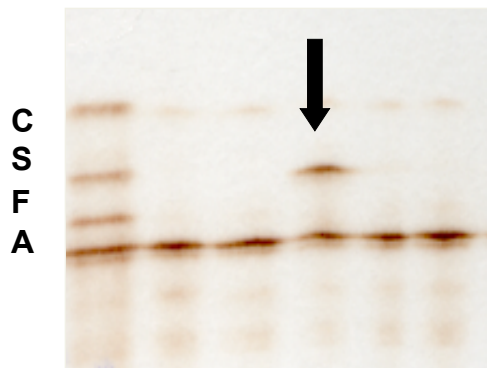
Pesquisa de corpos de inclusão de Hb H

✓ Técnicas electroforéticas

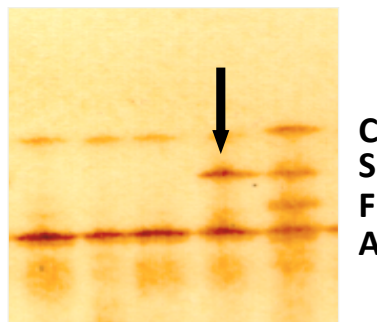
Focagem isoelectrica em gel de poliacrilamida

técnica de electroforese em gel de poliacrilamida, que permite a separação de proteínas de acordo com o seu ponto isoelectrico.

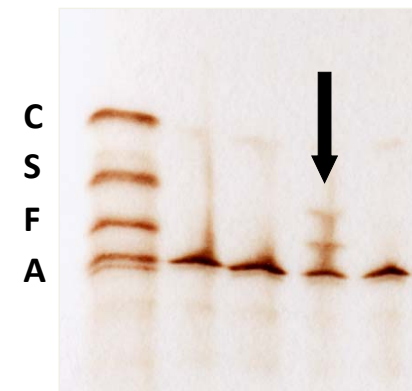
Hb D



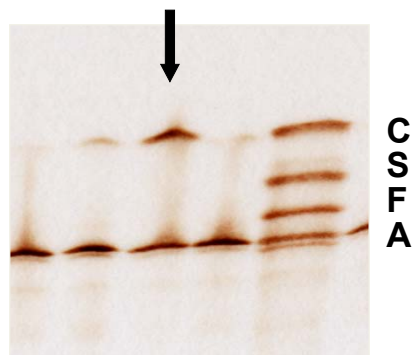
Hb S



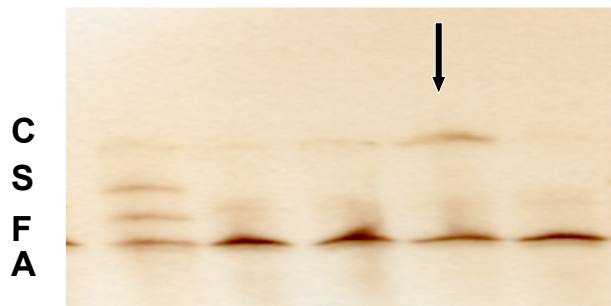
Hb Lepore



Hb C



Hb E



✓ Técnicas cromatográficas

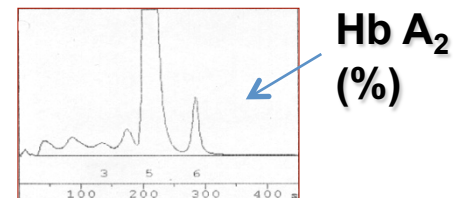
HPLC de troca iônica da hemoglobina

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

Separa as hemoglobinas com base na sua carga global

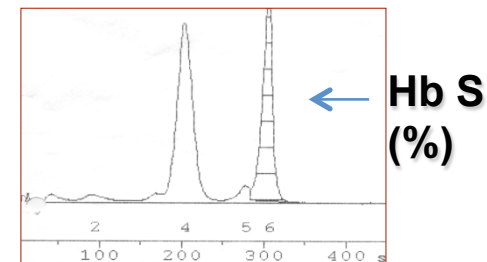
Frações normais :

- ✓ Quantificação relativa dos níveis de Hb A₂ – **Port β tal**
- ✓ Quantificação relativa dos níveis de Hb F– **Port δβ tal e HPFH**



Frações anómalas:

- ✓ Quantificação e Identificação presuntiva **de variantes de Hb** intervalos de tempos de retenção previamente estabelecidos: **Hb S, Hb D, Hb C, Hb E.**



✓ Técnicas cromatográficas

HPLC de troca catiónica

HPLC de fase reversa das cadeias de globina

A separação das cadeias de globina é baseada essencialmente na sua diferença de hidrofobicidade.

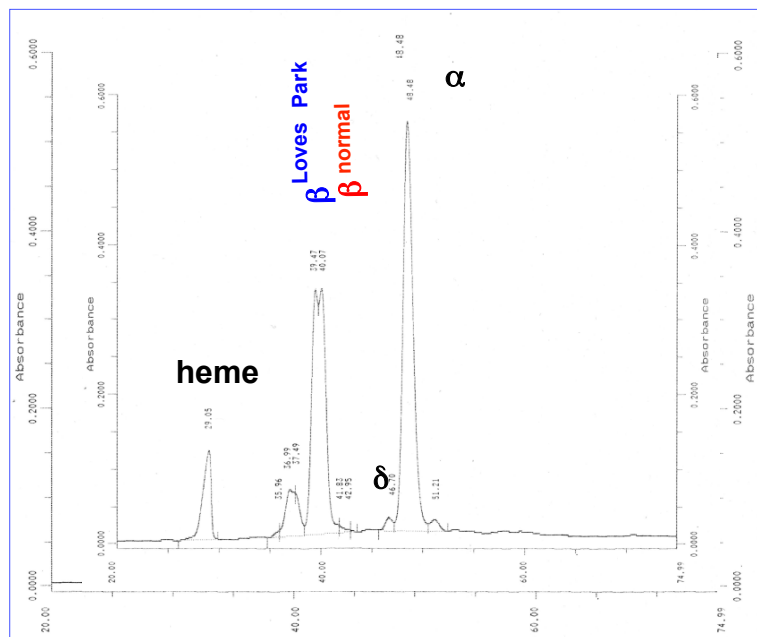


Identificação presuntiva e quantificação de variantes estruturais da hemoglobina- variantes neutras

Identificação das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ da Hb F – HPFH, β talassémia, drepanocitose.

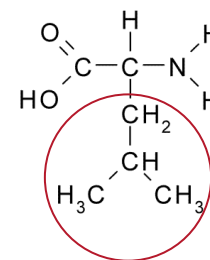
Variantes de hemoglobina neutras

Sex/age	M 2 years old
RBC ($\times 10^{12}/L$)	3.70
Hb (g/dL)	9.2
Hct (L/L)	0.277
MCV (fL)	74.9
MCH (pg)	24.9
MCHC (g/dL)	33.3
RDW (%)	14.1

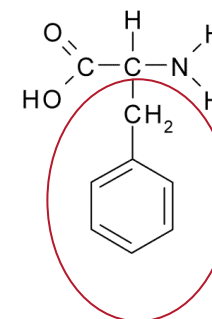


Hb Loves Park:

Substituição na posição 68 da cadeia beta:



Leucina



Fenilalanina

Reversed phase HPLC of globin chains, revealing the presence of β Loves Park chains (48.4%) and β normal chains (49.3%).

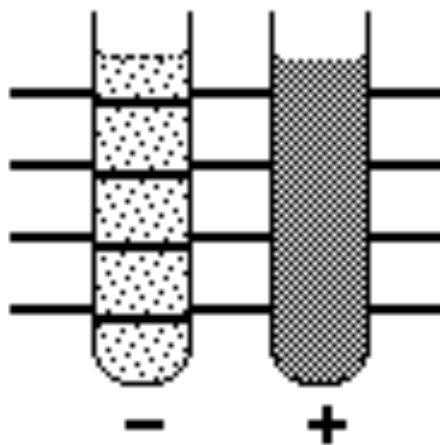
✓ Estudos funcionais da Hb

Teste de solubilidade da HbS

Teste de estabilidade - Teste do isopropanol

Pesquisa de corpos de inclusão de Hb H

Teste qualitativo que se baseia no facto da Hb S na sua forma desoxigenada (reduzida) polimerizar quando em solução de fosfatos de alta molaridade contendo um agente redutor (ditionito de sódio).



Positivo

Antenatal screening: combinations that give rise to the risk of a foetus affected by a severe haemoglobinopathy

(adapted from the work of Prof. B. Modell and published by the UK National Screening Committee)

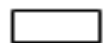
		Mother										
Carrier of:		Hb S	β -thalassaemia	$\delta\beta$ -thalassaemia	Hb Lepore	Hb E	Hb O _{Arab}	Hb C	Hb D _{Punjab}	HPFH*	α^0 -thalassaemia	α^+ -thalassaemia
Father	Hb S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	β -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	$\delta\beta$ -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb Lepore	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb O _{Arab}	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	Hb D _{Punjab}	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	HPFH*	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	α^0 -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	α^+ -thalassaemia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■



Serious risk: to offer counselling and antenatal diagnosis

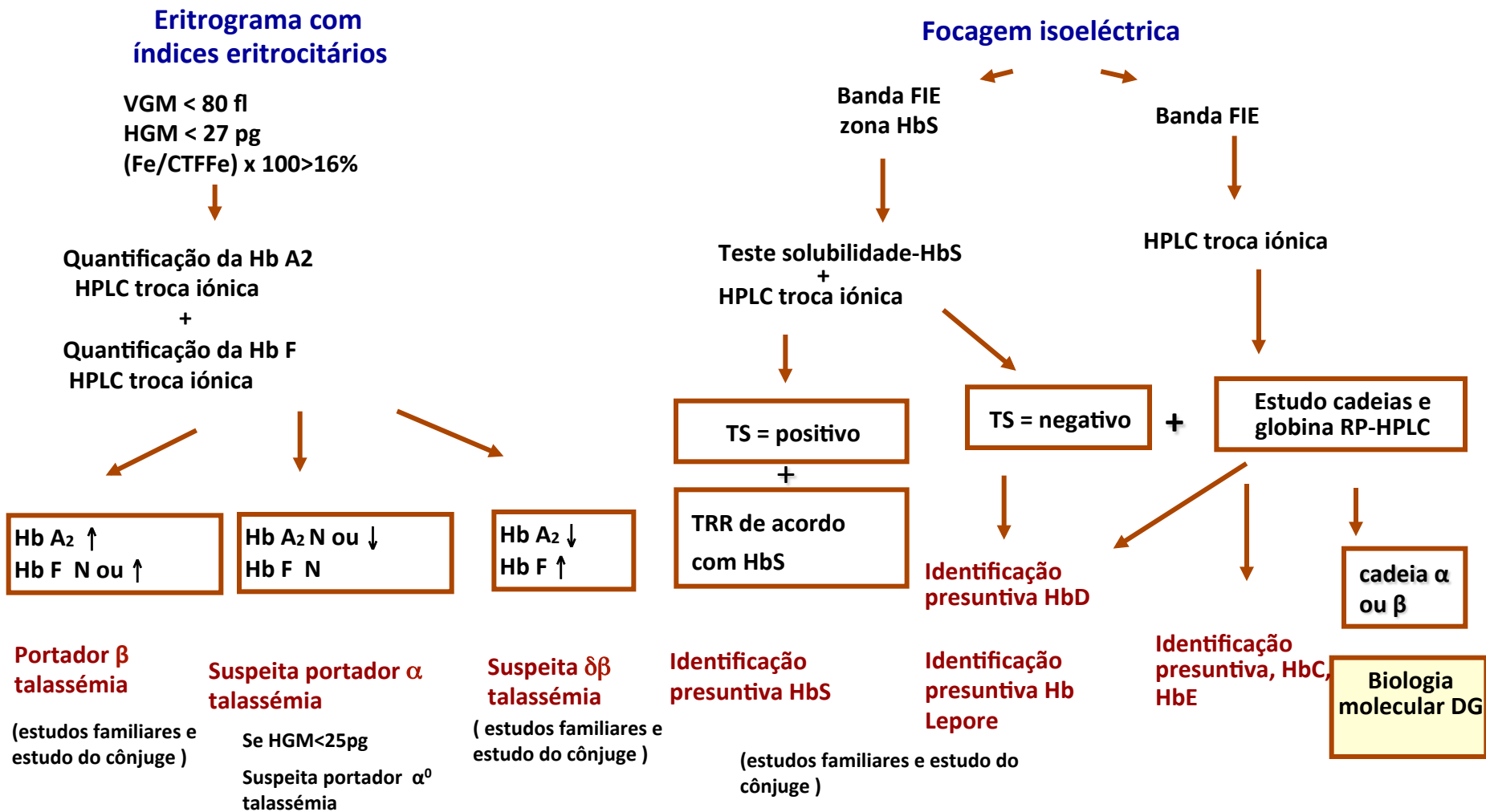


Less serious risk: to offer counselling and further investigation maybe required



No risk

Fluxograma do diagnóstico laboratorial

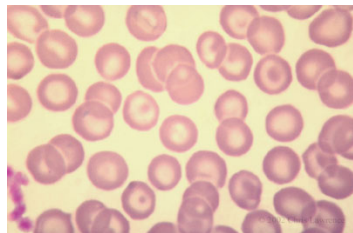


Portador de beta-talassemia

Sexo: M
Idade: adulto
Origem: caucasiana

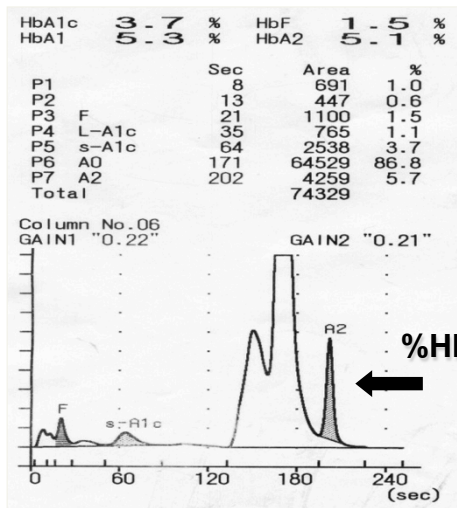
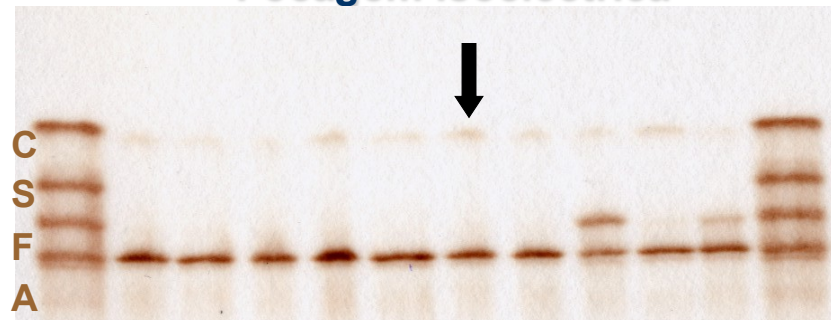
Hemograma

Hb=12,6 g/dL
G.V.=6,21x10¹²/L
Hct=0,386
VGM=62,2 fL
HGM=20,3 pg
CHGM=32,6 g/dL
RDW=16,4%

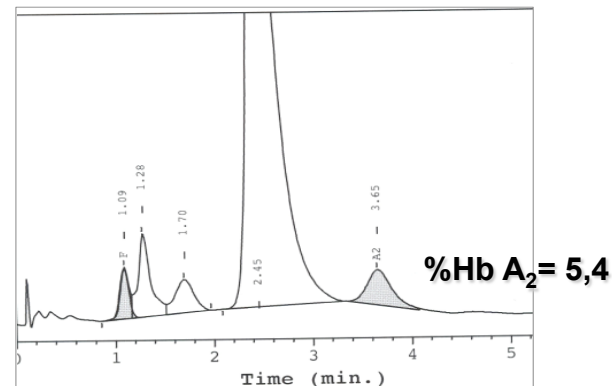


Esfregaço de sangue periférico após coloração - GV microcíticos, hipocrômicos

Focagem Isoelétrica



HPLC - HA 8160



HPLC - Variant II

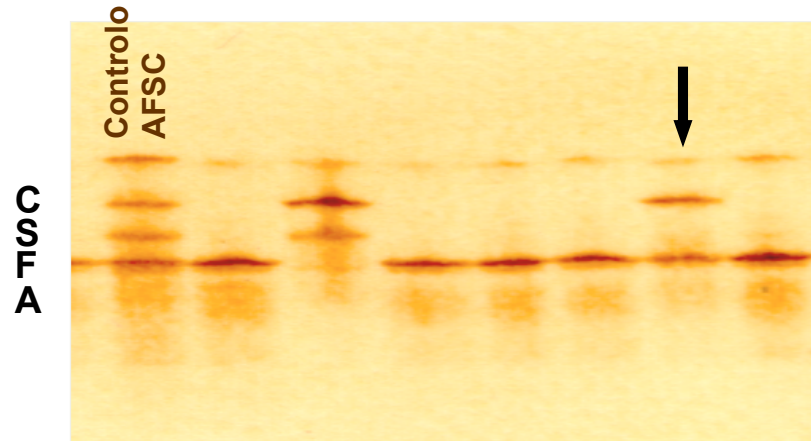
Portador de Hb S (heterozigotia)

Sexo: F
 Idade: 33 anos
 Origem: -

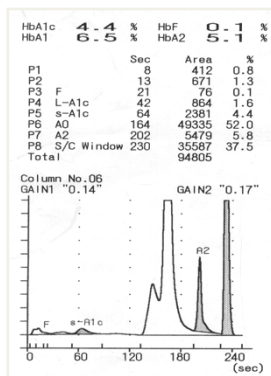
Hemograma

Hb=12,4 g/dL
 G.V.= $4,52 \times 10^{12}/L$
 Hct=0,379
 VGM=83,9 fL
 HGM=27,5 pg
 CHGM=32,7g/dL
 RDW=13,7%

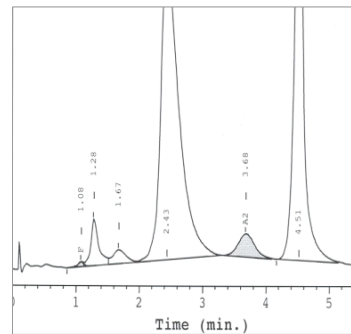
Focagem Isoelétrica



HPLC troca iônica



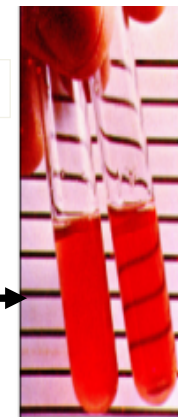
HPLC - HA 8160



HPLC - Variant II

Teste de solubilidade:

Positivo



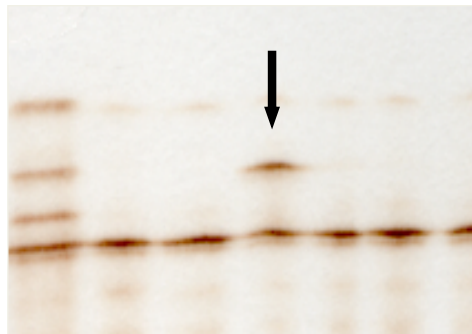
Portador de Hb D (heterozigotia)

Sexo- F
Idade-adulto
Origem Geog.-Beja

Hemograma

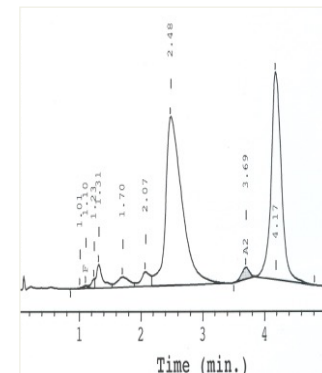
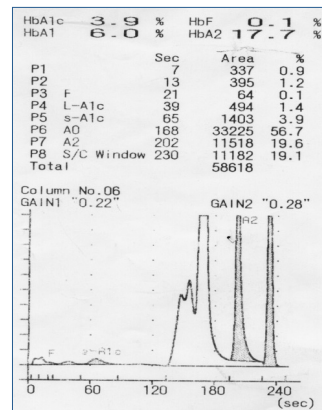
Hb=13,2g/dL
G.V.= $4,07 \times 10^{12}/L$
Hct=0,399
VGM=98,1 fL
HGM=32,5pg
CHGM=33,1 g/dL
RDW=12,3%

Focagem Isoelétrica



C
S
F
A

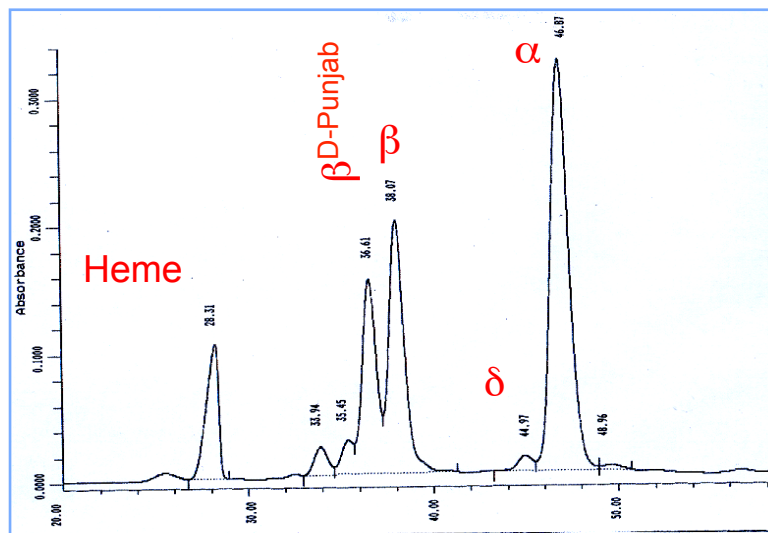
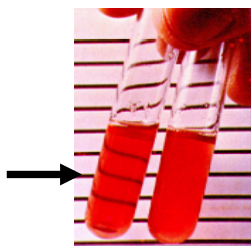
HPLC – troca iónica



HPLC de Fase Reversa das cadeias de globina

Teste de solubilidade:

Negativo.



Área α = 370,025
Área não α = 378,854

Variante Hb cadeia β

$$TRR = \frac{tr \beta^x}{tr \beta}$$

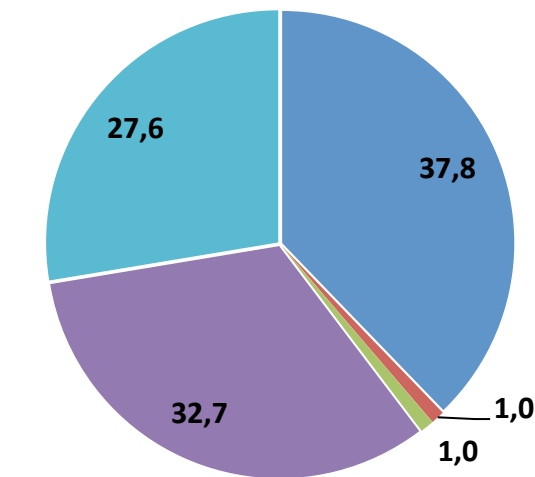
Hb D-Punjab = 40,9%

Casuística e atividade laboratorial: hemoglobinopatias 2010 - 2013

Entidades requisitantes:

- Clínicos: ARSs, Hospitais, particulares
- Laboratórios Saúde pública (ARSs)
- Laboratórios privados

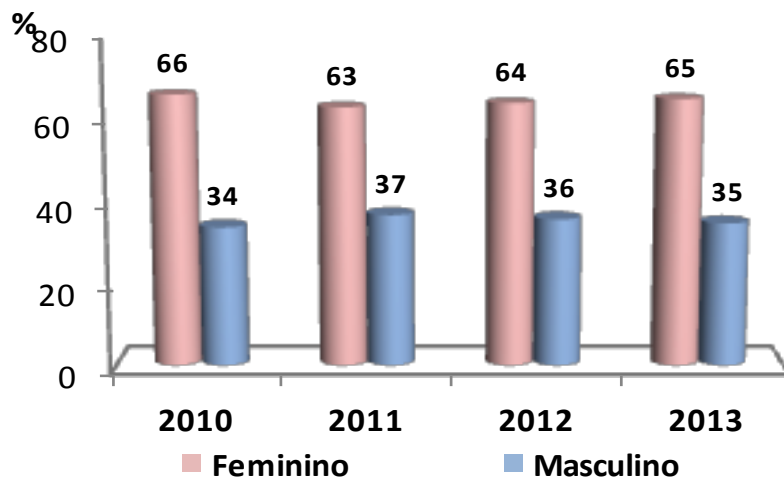
Percentagem amostras / ARSs
2013



- ARS Algarve
- ARS Centro
- ARS Norte
- ARS Lisboa e Vale do Tejo
- ARS Alentejo

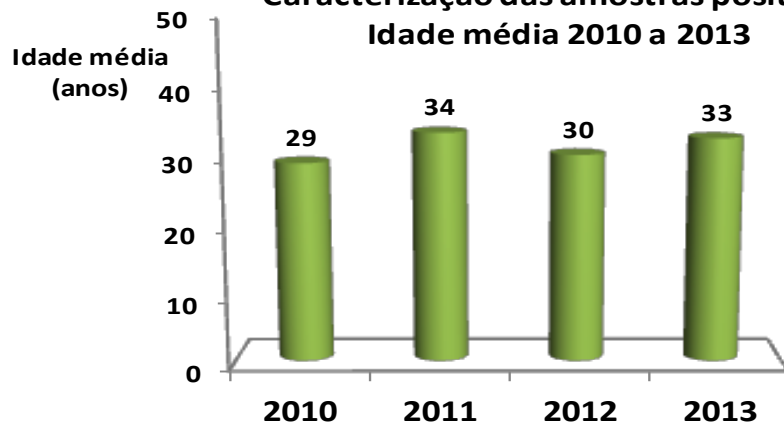
Casuística e atividade laboratorial : hemoglobinopatias 2010-2013

**Caracterização das amostras positivas:
Feminino e Masculino 2010 a 2013**



➤ Os portadores são detetados com maior frequência no **sexo feminino**:
mulheres grávidas ou em idade fértil

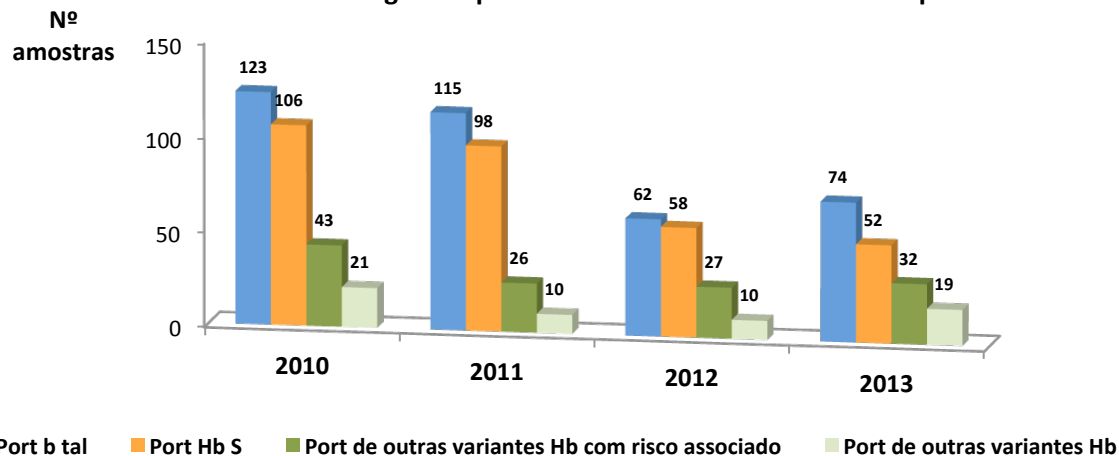
**Caracterização das amostras positivas:
Idade média 2010 a 2013**



➤ A idade média de diagnóstico coincide em geral com a idade fértil

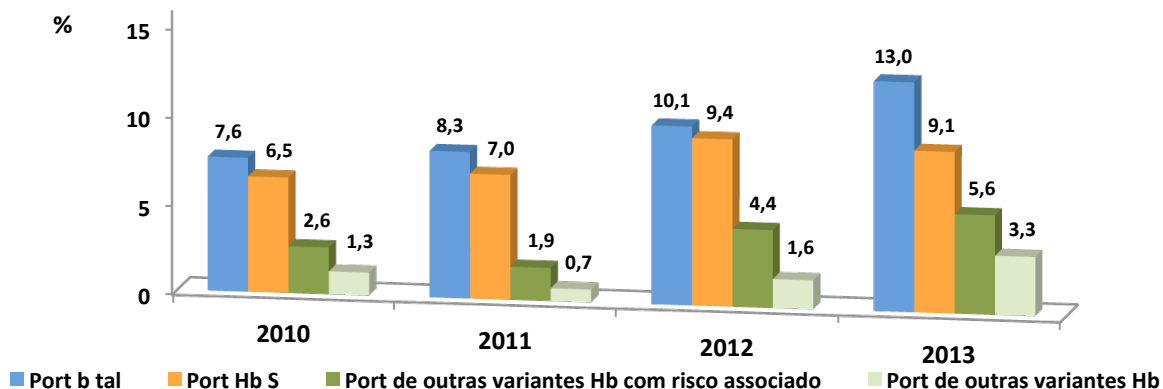
Casuística e atividade laboratorial : hemoglobinopatias 2010-2013

Casuística de hemoglobinopatias de 2010 a 2013: Nº amostras positivas



❖ Portadores β -tal e HbS são os mais frequentes

Casuística de hemoglobinopatias de 2010 a 2013: % de amostras positivas



❖ Percentagem significativa de outras variantes de hemoglobina

❖ Entre 2010 e 2013 foram identificados/caracterizados dez casais em risco

A forma mais eficaz de controlo desta patologia é a prevenção:

Deteção e identificação de portadores de hemoglobinopatias

rastreios e confirmações em colaboração com laboratórios de saúde pública, e outras entidades de saúde, públicas e privadas

Aconselhamento genético de casais em risco

Oferta de diagnóstico pré-natal

Estabelecimento de centros de referência de acordo com as recomendações

Investigação em hemoglobinopatias

Realização de registos

Formação do pessoal de saúde e do público em geral

estágios, atividades letivas, seminários, elaboração de folhetos de divulgação, colaboração com o PNAEQ

❑ Formação e ensino: **colaboração com o PNAEQ**





Média do N° de participantes: 21

Dados laboratoriais e clínicos enviados: idade, sexo, etnia /origem geográfica hemograma/eritrograma

- ✓ **Quantitativos - avaliação de equipamentos/metodologias: Hb A₂ , Hb F, Hb S, Hb Lepore**

Comparação com laboratórios peritos

CV%, % de corretos (ID)

- ✓ **Qualitativos**

Identificação da fração

Comparação com laboratórios peritos e identificação de corretos

- ✓ **Casos de estudo**

Crítérios de seleção: interesse clínico e disponibilidade de amostras

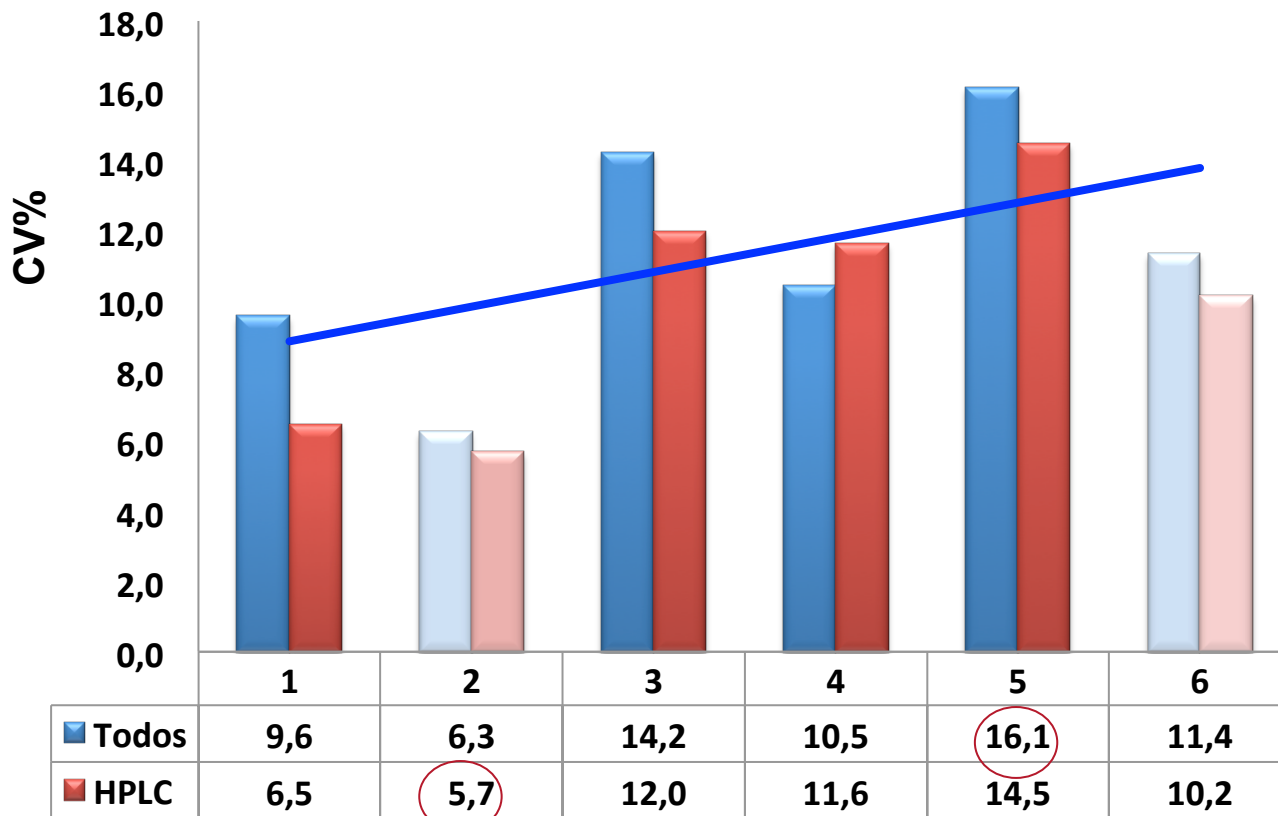
Análise das respostas e comentários dos laboratório peritos:

Qualificação na interpretação de resultados

Avaliação de conhecimentos e competências

✓ Quantitativos : avaliação de equipamentos/metodologias: Hb A₂

CV % Hb A₂, níveis normais e elevados-2011-2013



Ensaio

■ Todos - Patológico
 ■ HPLC - Patológico

✓ Quantitativos : avaliação de equipamentos/metodologias: Hb A₂

Exatidão % Hb A₂ , níveis normais e elevados-2011-2013

	Todos os métodos							Hb A ₂ Normal							
	N	Alvo	Mínimo	Máximo	Média ±2S	CV%	% resultados insatisfatórios	N	Alvo peritos	Alvo	Mínimo	Máximo	Média ±2S	CV%	% insatisfatórios
2011-amostra liof	22	2,7	1,7	3,2	2,2 - 3,2	9,6	0,0	15	-	2,7	2,4	2,9	2,3 - 3,0	6,5	0,0
2012-amostra liof	24	3,2	2,5	4,0	2,3 - 4,1	14,2	22,7	16	3,0	3,2	2,6	3,9	2,5 - 4,0	12,0	14,3
2013- sangue EDTA	21	2,6	2,1	4,5	2,0 - 3,1	10,5	4,8	15	2,6	2,6	2,1	4,5	2,0 - 3,2	11,6	6,7
2013-amostra liof	21	3,1	2,3	4,0	2,1 - 4,1	16,1	28,6	15	2,9	3,2	2,3	3,9	2,3 - 4,1	14,5	33,3

	Todos os métodos							Hb A ₂ Elevada							
	N	Alvo	Mínimo	Máximo	Média ±2S	CV%	% resultados insatisfatórios	N	Alvo peritos	Alvo	Mínimo	Máximo	Média ±2S	CV%	% insatisfatórios
2011-amostra liof	23	4,7	3,9	5,2	4,1 - 5,3	6,3	0,0	17		4,7	3,9	5,2	4,2 - 5,2	5,7	0,0
2013- sangue EDTA	23	4,7	3,8	6,0	3,7 - 5,8	11,4	0,0	17	4,8	4,8	3,9	5,7	3,8 - 5,7	10,2	0,0

• Amostras normais-3 ensaios, respostas >3, 5 % (limiar para o diagnóstico β tal)

• Hb A₂ nível normal

% resultados insatisfatórios (todos os métodos): 4,8- 28,6%

% resultados insatisfatórios (HPLC): 6,7-33,3 %

Doseamento da Hb A₂

✓ Precisão (AEQ)

HPLC-todos– CV: 5,7 a 14,5%

HPLC (do mesmo fabricante)- CV: 6,0 a 8,0 % (bibliografia)

✓ Percentagem de resultados insatisfatórios

Não se verificou uma diferenciação das amostras normais e patológicas por todos os laboratórios participantes

Todos os métodos : 4,8-28,6 % HPLC: 6,7-33,3 %

Melhoria na qualidade dos doseamentos da Hb A₂

Calibração dos equipamentos, aferição com materiais certificados , avaliação do controlo de qualidade interno , participação em programas de AEQ

Envio de amostras para avaliação técnica dos equipamentos- PNAEQ

Bibliografia – Paleari *et al.* External quality assessment of Hb A₂ measurement: data from na italian pilot study with fresh whole blood samples and commercial HPLC systems. Clin Chem Lab Med 2007;45:88–92

Agradecimentos

❖ Equipa de trabalho:

Maria Teresa Seixas

Sandra Costa

Gisela Gaspar

Filomena Seuanes

Sandra Copeto



❖ Colegas do Departamento de Genética Humana

❖ Colegas do PNAEQ e Grupo de trabalho de Hematologia